

Manipulación genética de la síntesis de enzimas fúngicas de uso en industrias de alimentos

R. González, J. A. Pérez-González, L. Ventura, P. Sánchez, P. Sanz,
M. T. Fernández Espinar, S. Vallés, F. Piñaga y D. Ramón*

*Unidad de Bioingeniería de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España).*

Summary

Food industries use a great variety of enzymes as additives. The main percentage of them are produced by species of filamentous fungi. In this review we present the strategies to purify and overproduce this kind of enzymes using recombinant DNA techniques.

Key words: enzymes, purification, synthesis, recombinant DNA techniques.

Resumen

Las industrias de alimentos usan un gran número de enzimas como aditivos. Muchas de ellas son producidas por especies de hongos filamentosos. En esta revisión se presentan los distintos pasos encaminados a la purificación y sobreproducción industrial de algunas de estas enzimas utilizando técnicas de DNA recombinante.

Introducción

Producción de enzimas alimentarias: Una visión global del problema

El uso de enzimas como aditivos es una constante en muchas industrias de alimentos. El mercado mundial de estos compuestos mueve anualmente importantes cifras de dinero, siendo de destacar el hecho de que la producción industrial de los mismos se encuentra en manos de unas pocas compañías, en su mayoría europeas. Fundamentalmente las enzimas de mayor interés son las proteasas, con un 59 % del mercado de ventas, seguidas por las carbohidrasas, que constituyen un 28 % del mismo.

Los proyectos de investigación encaminados a la producción de este tipo de actividades enzimáticas presentan 2 problemas evidentes. Por un lado, la competencia que los grupos de investigación de las multinacionales del sector representan, y por otro, la necesidad de constituir equipos mixtos con tecnólogos de alimentos, microbiólogos, bioquímicos y biólogos moleculares. Para re-

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

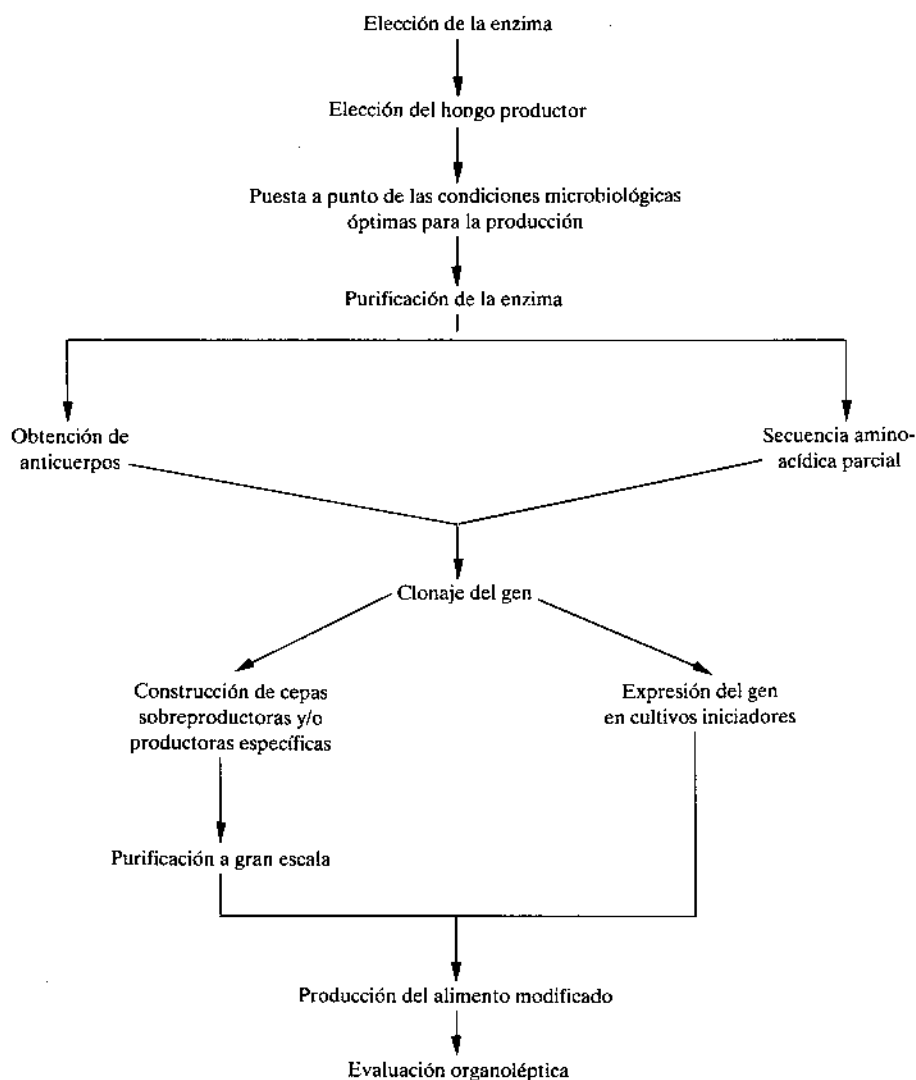


Fig. 1. Esquema de trabajo en la producción de enzimas.

solventar el primer problema las únicas soluciones viables son o cooperar con los grandes grupos industriales o buscar actividades enzimáticas que, por su particular modo de acción, son originales en el sentido de innovación que este término conlleva. Para solventar el segundo problema es necesario disponer de un esquema eficaz de trabajo en el que las tareas estén divididas tanto en el tiempo como en el espacio. En resumen, cada miembro del equipo debe conocer su función y saberla encajar en el esquema.

Es difícil definir un esquema global de trabajo, ya que éste depende de la enzima objeto de estudio y del alimento en que se va a aplicar. Un esquema amplio aparece en la Figura 1. Evidentemente, todo el trabajo comienza con la elección por parte de un tecnólogo de alimentos de la enzima deseada. A partir de ahí será necesario encontrar un microorganismo que lo produzca, estudiar las condiciones de crecimiento en las que este microorganismo produce óptimamente la enzima y posteriormente purificar la misma. Este trabajo es propio de microbiólogos y bioquímicos.

Estos últimos deben obtener una fracción de la enzima lo suficientemente pura como para conseguir anticuerpos contra el mismo y/o información parcial sobre su secuencia aminoacídica. Tanto lo uno como lo otro serán herramientas valiosas en las manos de los biólogos moleculares que, o bien por escrutinio inmunológico o por escrutinio con sondas de DNA, clonarán el gen que codifica la enzima purificada. A partir de este punto, y dependiendo del alimento, se puede optar por 2 vías no excluyentes entre sí. Una común, sea cual fuere el tipo de alimento, es la producción masiva y económica de la enzima. Para ello habrá que construir cepas del microorganismo productor que o bien sobreproduzcan la enzima o bien la produzcan en condiciones más idóneas (producción específica) o baratas (medios de cultivo económicos). Esto implica un trabajo exhaustivo de biología molecular que en muchas ocasiones incluso requiere el desarrollo de sistemas de transformación genética. El final del proceso es la obtención de cepas manipuladas genéticamente a partir de las cuales purificar de forma rápida y económica la enzima deseada que se adicionará al alimento. Para este paso deben volver a intervenir los bioquímicos, aunque en esta ocasión los criterios de pureza deben ser mucho menos estrictos. La segunda vía alternativa es aplicable en aquellos alimentos que se producen por fermentación microbiana (cerveza, pan, vino, derivados lácteos, etc.). En este caso puede resultar más conveniente introducir los genes fúngicos en las levaduras o bacterias ácido-lácticas usadas como iniciadores y conseguir que se expresen y secreten los productos génicos. De esta forma el propio microorganismo produce la enzima, con lo que el proceso se abarata considerablemente. Ahora bien, el posible rechazo social al uso de alimentos producidos con microorganismos recombinantes puede originar dificultades en este tipo de estrategias. No por ello es una alternativa desdeñable, sino todo lo contrario, ya que sin lugar a dudas esta será la vía de futuro. En resumen, sea cual fuere la alternativa seguida, el resultado final es la producción de un alimento modificado por la actuación de una enzima. Este alimento presenta diferencias con respecto al original, por lo que se hace necesaria una evaluación organoléptica que tendrán que llevar a cabo tecnólogos de alimentos.

Nuestro grupo de trabajo está interesado en la sobreproducción de ciertas carbohidrasas. Estas enzimas son un grupo heterogéneo que abarca tanto actividades capaces de degradar la celulosa o la hemicelulosa como enzimas tales como las amilasas, capaces de degradar el almidón a glucosa. Las celulasas y hemicelulasas tienen un interés evidente en la fabricación de alimentos líquidos de origen vegetal, al formar tanto la celulosa como la hemicelulosa (arabano, xilano), haces que producen problemas de filtración y estabilidad coloidal. Asimismo, estas mismas enzimas pueden ser de interés en la fabricación de alimentos como el pan o el vino, ya que al actuar sobre las paredes celulares de los tejidos del sustrato vegetal producen cambios organolépticos en el producto final. En cuanto a las amilasas, es de todos conocido su uso en la producción de alimentos dietéticos con bajo contenido calórico, tan de moda en nuestros días. Tomando en cuenta todas estas consideraciones, nuestro trabajo durante los últimos 2 años se ha centrado en el estudio de 4 carbohidrasas: arabinasas, xilanasas, endoglucanasas y glucoamilasas.

Los hongos filamentosos constituyen el grupo microbiano idóneo en el que estudiar este tipo de enzimas. Las razones son obvias: por un lado, son muchas las especies fúngicas capaces de producir este tipo de enzimas, y por otro, lo hacen secretándolas con una eficacia extraordinaria que llega a ser en ocasiones del orden de 20 a 40 g de la enzima por litro de medio de cultivo. En nuestro trabajo con las enzimas reseñadas en el párrafo anterior hemos escogido 3 especies de hongos filamentosos: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* y *Trichoderma longibrachiatum*. Los 2 últimos son conocidos productores de actividades celulolíticas, hemicelulolíticas y amilolíticas. Por el contrario, *A. nidulans* no es un potente productor, pero es un modelo de estudio en el que se dispone de todas las técnicas básicas de manipulación genética, así como de una amplia colección de mutantes tanto en genes estructurales como reguladores. De esta forma, el estudio de la regulación de la síntesis de estas enzimas puede llevarse a cabo en *A. nidulans* y extrapolar las conclusiones en *A. terreus* y *T. longibrachiatum*.

TABLA 1
ARABINASAS Y XILANASAS PURIFICADAS EN EL HONGO
FILAMENTOSO *A. NIDULANS* (2, 6)

Enzima	Actividad	pI
ExoA	α -L-arabinofuranosidasa	3,3
EndoA	Endo-arabinasa	3,25
pI	α -L-arabinofuranosidasa	3,3
pII	Endo-arabinasa. Xilanasa	6,0
pIII	α -L-arabinofuranosidasa	3,5
Xil I	Xilanasa	6,5
Xil II	Xilanasa	3,5
Xil III	Xilanasa	3,5

En este trabajo pretendemos revisar los pasos necesarios en la sobreproducción de enzimas fúngicas de uso alimentario, ilustrándolos con los resultados de nuestro grupo de trabajo durante los 2 últimos años.

Optimización de las condiciones de producción. Purificación de las enzimas

Como antes se indicó, todo el trabajo comienza con la elección de una enzima y su purificación. Para ello es conveniente definir unas condiciones microbiológicas de cultivo óptimas para su producción. No es lo mismo purificar una enzima de un caldo de cultivo, en el que esta proteína representa un 10% del total de proteínas, que hacerlo de un medio de cultivo en el que, dadas unas especiales condiciones de inducción, estas enzimas sean mayoritarias.

Un ejemplo ilustrativo de esta estrategia lo constituye nuestra experiencia en la purificación de distintas actividades que degradan arabanos en *A. nidulans* (6). Estas enzimas son producidas a altos niveles en medios que contienen pulpa de remolacha como fuente de carbono. Sin embargo, en estas condiciones de cultivo aparecen otras muchas proteínas en el sobrenadante. Por el contrario, un compuesto de degradación de los arabanos, el arabitol, es un inductor específico de estas enzimas, de forma que en presencia de este compuesto todas las enzimas secretadas están implicadas en la degradación de arabanos y algunas de ellas constituyen más del 40% de la proteína extracelular. Hemos podido determinar una situación similar en el caso de la producción específica de xilanasas en *A. nidulans* al crecer este hongo en presencia de xilano como única fuente de carbono (2). En estas condiciones especiales de inducción la purificación es sencilla. De estos ejemplos es posible extraer una conclusión importante. Es necesario llevar a cabo trabajos básicos sobre la regulación de la síntesis de las enzimas, ya que ello puede constituir un importante primer paso de purificación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de producción se debe purificar la enzima. El esquema de purificación dependerá en cada caso de la enzima, pero normalmente se basa en el empleo de precipitaciones selectivas con sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica e isoelectroenfoque. Utilizando estas técnicas, recientemente nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo la purificación y caracterización físico-química y cinética de varias arabinasas y xilanasas de *A. nidulans* (Tabla 1).

A partir de este punto, la proteína purificada se utilizará para obtener anticuerpos o secuenciar el extremo amino terminal o fragmentos de digestión peptídica de la misma.

Clonaje de los genes

Los anticuerpos obtenidos en el apartado anterior se pueden usar para llevar a cabo un escrutinio inmunológico de genotecas de cDNA construidas en condiciones de inducción. En este sentido la información sobre la regulación de la síntesis de las enzimas vuelve a ser de extraordinario interés. Evidentemente también es posible llevar a cabo este escrutinio con oligonucleótidos sintéticos que codifiquen la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la enzima purificada.

Si se dispone de información sobre la secuencia nucleotídica de genes similares clonados en otros hongos filamentosos es posible llevar a cabo un escrutinio por hibridación heteróloga. En nuestro trabajo con endoglucanasas y glucoamilasas hemos optado por esta vía. Se han clonado distintos genes de hongos filamentosos que codifican β -(1,4)-endoglucanasas (5). Un fragmento central de uno de ellos fue sintetizado en nuestro laboratorio mediante la técnica de PCR y dicho fragmento se utilizó como sonda frente a genotecas del hongo filamentoso *T. longibrachiatum*. Las señales positivas revelaron la presencia de un gen que denominamos *egl1*, y que codifica una endoglucanasa de interés en industrias cerveceras (4). El gen presenta 2 intrones de 61 y 123 bp y la proteína codificada tiene una masa molecular de 48341, con un péptido señal de 22 aminoácidos y 5 sitios putativos de glicosilación.

De forma similar se clonó mediante PCR un fragmento de un gen de *A. niger* que codifica una glucoamilasa (1). Este fragmento se usó como sonda frente a genotecas de *A. terreus*, dando lugar al clonaje de 2 genes que denominamos *gla1* y *gla2*, los cuales presuntamente codifican actividades glucoamilolíticas (L. Ventura *et al.*, en preparación).

Sobreproducción y/o producción específica de las enzimas en las cepas fúngicas

El disponer de los genes clonados nos permite diseñar construcciones y cepas en las que el gen que codifique la enzima se sobreproduzca o se produzca específicamente. Conceptualmente, la sobreproducción es fácil de comprender. Un aumento en el número de copias del gen, es decir, un aumento en la dosis génica, debe llevar en paralelo un aumento en la producción de la enzima. En cuanto a la producción específica, el cambio del promotor original del gen clonado por promotores mutados *in vitro* o por promotores de otros genes que respondan a señales muy específicas puede dar lugar a una sobreproducción o a una producción específica, respectivamente.

Teóricamente, estas tareas moleculares no son difíciles de realizar. Ahora bien, muchas veces tropiezan con el problema de que las nuevas copias del gen obtenidas *in vitro* deben ser reintroducidas en el organismo para que funcionen *in vivo*. Este hecho exige el disponer de sistemas de transformación genética para los hongos productores. Si bien existen protocolos de transformación para muchos hongos filamentosos, incluidas especies productoras de enzimas, para otros muchos hongos estos sistemas no existen (3). En este caso es necesario desarrollarlos. En nuestro trabajo con *A. terreus* y *T. longibrachiatum* nos enfrentamos con la falta de protocolos de transformación para estos microorganismos. Por ello hemos desarrollado sistemas que permiten la toma de DNA foráneo. En el caso de *A. terreus* se han desarrollado 2 métodos basados en la resistencia a higromicina B (7) y la complementación de un mutante auxótrofo en arginina (8). En el caso de *T. longibrachiatum* se ha desarrollado un sistema de resistencia a higromicina B (P. Sánchez *et al.*, en preparación). Mediante estos sistemas de transformación es posible introducir múltiples copias de los genes *egl1*, *gla1* y *gla2*, dando lugar a cepas que sobreproduzcan β -(1,4)-endoglucanasa o glucoamilasa, respectivamente.

En el caso de la producción específica hemos abordado 2 estrategias distintas. La primera de ellas se basa en la expresión del gen *egl1* de *T. longibrachiatum* bajo el control del promotor *alcA* de *A. nidulans* (D. Ramón *et al.*, en preparación). Este último gen codifica una alcohol deshidrogenasa que está sometida a represión por catabolito. Por el contrario, el gen se induce no sólo en

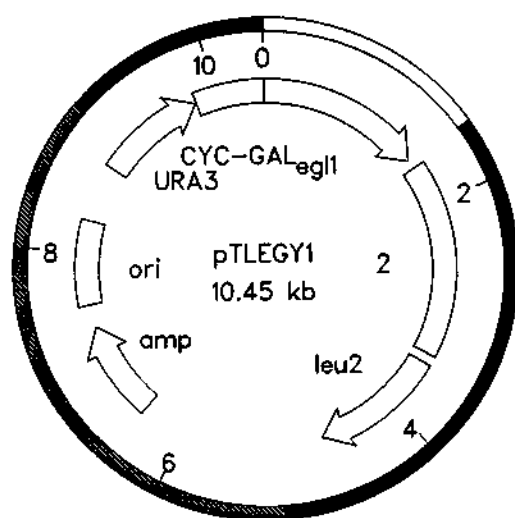


Fig. 2. Mapa físico del plásmido pTLEGY1.

presencia de etanol, sino también de otros inductores gratuitos más baratos, como la treonina. Por técnicas de PCR hemos puesto el gen *egl1* bajo el control de *alcA*. En presencia de fructosa y treonina *A. nidulans* no secreta apreciablemente proteínas. Por ello la introducción de este gen recombinante en *A. nidulans* dará lugar a cepas que en dichas condiciones de cultivo produzcan específicamente la endoglucanasa de *T. longibrachiatum*. Una estrategia alternativa ha consistido en la expresión del gen *egl1* en cepas de *S. cerevisiae*. Para ello hemos construido el cDNA del gen, ya que los intrones fúngicos no son procesados por la levadura, y lo hemos puesto bajo el control de un promotor fúngico inducible por galactosa (Fig. 2). La expresión de este gen en cepas de *S. cerevisiae* es inducible por galactosa y da lugar a la secreción de la endoglucanasa fúngica de una forma específica (4). En ambos casos la expresión en *A. nidulans* y en *S. cerevisiae* logra crear una situación fisiológica artificial en la que la proteína a purificar es si no la única apreciable, sí la mayoritaria en el medio de cultivo.

Expresión de los genes clonados en cultivos iniciadores

Como se comentó anteriormente, en los alimentos obtenidos por fermentación microbiana puede resultar interesante expresar directamente los genes clonados en los cultivos iniciadores. Dado que normalmente estos cultivos iniciadores son levaduras (vino, cerveza, pan) o bacterias lácticas (derivados lácteos), evidentemente es necesario no sólo trabajar con cDNAs de los genes en los que los intrones no estén presentes, sino también poner los genes clonados bajo el control de un promotor de la propia levadura o bacteria ácido-láctica.

En el caso del gen *egl1* hemos llevado a cabo construcciones en las que el gen se encuentra bajo el control de un promotor levaduriforme. Ya que en estos casos interesa una expresión fuerte y continua del gen (cuanto más enzima haya mejor), optamos por colocar el gen *egl1* bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo. La elección se centró en el promotor de la actina, construyéndose por PCR un gen recombinante que aparece en la Figura 3. Con esta construcción se han transformado cepas de levaduras cerveceras, panaderas y vínicas que secretan la endoglucanasa fúngica (J. A. Pérez-González *et al.*, en preparación). El paso siguiente será la producción de los alimentos respectivos con estas nuevas cepas industriales.

En resumen, nos enfrentamos al comienzo de una nueva era en la tecnología de alimentos.

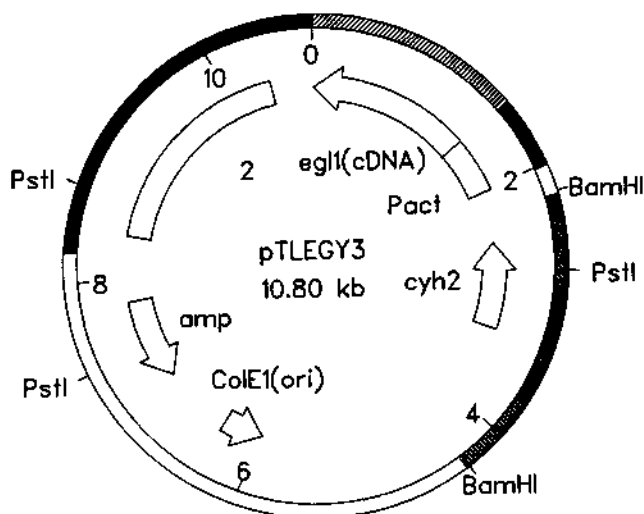


Fig. 3. Mapa físico del plásmido pTLEGY3.

Con el advenimiento de las nuevas técnicas del DNA recombinante y la creación de equipos mixtos, por primera vez el único límite al diseño racional de las cepas industriales será nuestra imaginación. Las herramientas están desarrolladas. Ahora sólo falta empezar a usarlas.

Agradecimientos

El trabajo de nuestro grupo es subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Proyectos ALI90-0842, ALI90-1233-E y ALI91-0732). Los autores agradecen el constante apoyo del doctor A. Flors.

Bibliografía

1. Boel, E., Hjort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K. E. and Fiil, N. P. (1984). Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* **3**, 1097-1102.
2. Fernández-Espinar, M. T., Ramón, D., Piñaga, F. and Vallés, S. (1992). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**, 91-96.
3. González, R. y Ramón, D. (1990). La transformación genética de los hongos filamentosos. *Rev. Iberoam. Micol.* **7**, 43-49.
4. González-García, R., Ramón, D. and Pérez-González, J. A. Cloning, sequence analysis and yeast expression of *eglI* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (En prensa.)
5. Penttillä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. and Knowles, J. (1986). Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* **45**, 253-263.
6. Ramón, D., v. d. Veen, P. and Visser, J. Purification of arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (En prensa.)
7. Ventura, L. and Ramón, D. (1991). Transformation of *Aspergillus terreus* with the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**, 189-194.
8. Ventura, L., Ramón, D. and Pérez-González, J. A. Isolation of an *Aspergillus terreus* mutant impaired in arginine biosynthesis and its complementation with the *argB* gene from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* (En prensa.)